

文章编号: 1674-5566(2018)06-0814-11

DOI:10.12024/jso.20180402288

克氏原螯虾泛素结合酶 *E2* 基因的克隆及其在卵巢中的表达分析

石宝通¹, 钱照君¹, 王 辉², 陆 伟³, 牛东红¹, 李家乐¹

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 淮阴师范学院, 江苏 淮安 223001; 3. 江苏盱眙满江红龙虾产业园有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 利用 RACE 技术获得了 *UB-E2* 基因 cDNA 全长, 通过 RT-PCR 技术研究 *UB-E2* 基因在不同组织、发育时期的表达量和 17α -羟孕酮激素刺激后 *UB-E2* 表达量及性腺发育情况。结果表明: 该基因序列全长 3 943 bp, 开放阅读框 675 bp, 编码 224 个氨基酸, 相对分子量 23.93 ku, 等电点 8.61, 82~219 位氨基酸序列为泛素结合酶家族特有的结构域。氨基酸序列比对发现, 克氏原螯虾 *UB-E2* 基因与节肢动物 *UB-E2* 基因有较高的同源性; 系统进化分析表明, *UB-E2* 基因与凡纳滨对虾和斑节对虾聚为一支。荧光定量结果显示, *UB-E2* 基因在克氏原螯虾卵巢组织中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$); 在卵巢发育初期表达量最低, 随后逐渐升高, 到产卵后期开始下降; 17α -羟孕酮刺激结果显示, 试验组卵巢发育速度明显加快, 同时 *UB-E2* 基因的表达量也显著上升, 卵巢发育速度和 *UB-E2* 基因表现为受 17α -羟孕酮刺激响应一致。推测 *UB-E2* 基因在克氏原螯虾的卵巢发育和配子发生中起着重要的作用, 本研究为克氏原螯虾性腺发育分子调控机制提供一定的理论依据。

关键词: 克氏原螯虾; 性腺; *UB-E2*; 表达

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 属于节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 爬行亚目 (Reptantia), 螯虾科 (Cabaridae), 原螯虾属 (*Procambarus*)^[1]。克氏原螯虾产业已在水产养殖业中占有重要地位并具有较大社会意义^[2]。随着市场对克氏原螯虾需求量的不断增加, 对于克氏原螯虾的繁殖这一环节又提出了新的要求。至今低繁殖率的问题仍制约着克氏原螯虾产业的发展, 这就需要研究克氏原螯虾生物学特性^[3,4], 完善苗种繁殖生产技术途径, 在探究克氏原螯虾繁殖习性的同时, 也要在分子层面上对克氏原螯虾的性腺发育及其繁殖进行研究。

泛素 (ubiquitin) 是一类由 76 个氨基酸残基组成的小分子蛋白质, 在结构上保守性非常高, 分子量约为 8 ku。泛素在各种真核细胞中广泛表达, 以单体、二聚体或寡聚体形式处于动态平

衡状态^[5]。泛素化修饰过程由泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme, *E1*)、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, *E2*) 和泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligase, *E3*) 三种酶共同催化完成, 将泛素共价连接到底物的赖氨酸残基上^[6-7]。其中 *E1* 负责激活泛素分子, 由于 *E1* 的高效性, 细胞内有足够活化形式的泛素分子供后续的连接反应, *E2*s 与 *E3*s 的配对决定了底物的泛素化修饰类型, 不同的 *E2*s 和 *E3*s 的组合使底物发生多种类型的泛素化修饰, 而 *E3* 负责特异性的识别靶标底物^[8-13]。许多研究表明, 泛素蛋白酶体途径 (ubiquitin proteasome pathway, UPP) 在动物的性腺发育以及繁殖过程中都发挥了重要的调控作用。SHEN 等^[14] 通过克隆获得了日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 的泛素结合酶基因 *E2r*, 认为其参与了配子发生及发育, 并且通过研究表明该基因的表达量在卵巢 III 期达到最高

收稿日期: 2018-04-21 修回日期: 2018-05-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2012AA10A400-3); 国家自然科学基金 (31472278); 上海知识服务平台 (ZF1206)

作者简介: 石宝通 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: shibaotong1992@163.com

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

值。KWON 等^[15]研究发现,泛素羧基末端水解酶 (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase, UCH) L1 与 L4 在小鼠的精原细胞中高表达,而 UCHL3 与 UCHL5 则在精母细胞和精子细胞中高表达,这说明 UCH 在小鼠配子发生和发育中发挥着重要的作用,不同基因发挥的作用也存在差异。

本实验以克氏原螯虾为研究对象,对泛素结合酶 *E2* 基因进行了克隆与表达分析,为研究克氏原螯虾卵巢发育分子调控机制提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

克氏原螯虾于 2017 年采自江苏盱眙满江红龙虾产业园有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因克隆

采用 Trizol 法提取各组织的总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, NanoDrop2000 分光光度计检测其浓度。以总 RNA 为模板,按照逆转录试剂盒说明书和 SMART RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA 以及 5'/3'-RACE-Ready cDNA。根据已构建的克氏原螯虾转录组文库中 *UB-E2* 基因的部分序列,设计短片段引物 F1、F2(表 1)用于目的片段的扩增。以 SMART RACE cDNA 为模板,以基因特异性引物 GSP-F2(或 GSP-R2)与 TaKaRa 试剂盒内的 UPM 引物,按照说明书分别进行 3' RACE 和 5' RACE 扩增(表 1)。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后割胶回收,纯化后连接到 GEM-T Easy 载体上,再转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,并挑选阳性克隆进行测序检验。

1.2.2 生物信息学分析

采用 DNASTAR 软件进行序列拼接得到完整的 cDNA 序列。利用 NCBI 网站上的 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对序列预测开放阅读框,用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测其理化参数,用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测其信号肽位置,用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析其跨膜结构,用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测其蛋白质的三级结构。通过 NCBI 网站查找其他物种的 *UB-E2* 基因的氨基酸序列,利用 BioEdit 软件对其氨基酸序列进行多重比对,并用 MEGA5 软件构建 NJ (Neighbor joining) 系统进化树。

1.2.3 组织表达分析

将克氏原螯虾于实验室暂养一周,取克氏原螯虾眼柄、鳃、肝胰腺、心脏、肌肉、肠和不同发育时期的卵巢组织并提取 RNA,根据 TaKaRa 试剂盒说明书合成用于 RT-PCR 反应的组织及卵巢发育各时期的 cDNA。以 RT-F3 和 RT-R3(表 1)为荧光定量引物,以 EIF^[16](表 1)作为内参基因,每个样本设置 3 个重复。反应体系如下: SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L, ddH₂O 6.8 μ L, RT-F3 与 RT-R3 各 0.8 μ L, cDNA 1.6 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 65 $^{\circ}$ C 5 s。通过 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法^[17]分析 *UB-E2* 基因在克氏原螯虾各组织及性腺发育各时期的相对表达量。采用 SPSS 18.0 软件^[18]对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 并通过 SigmaPlot 13.0^[19]绘制图片。

表 1 实验中所用到的引物及序列

Tab. 1 The primers and sequences in this experiment

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Amplification Target
F1	ATAGATTGTTGTCATCGCTC	短片段扩增
R1	AATAAAAATGCCCATCAGGT	
GSP-F2	ATTTCCGAGAGACCAATACACACG	3'RACE
GSP-R2	CTGACTGCCTTTGACATCTTGGGATTGG	5'RACE
RT-F3	TTGGCAGAGATCACGTTGGA	荧光定量
RT-R3	GGTCCAGAGCCGAGCAATTC	
EIF-F	GGAATAAGGGGACGAAGACC	内参
EIF-R	GCAAACACACGCTGGGAT	

1.2.4 17 α -羟孕酮刺激检测

实验克氏原螯虾于实验室养殖水桶(60 cm \times 90 cm)中暂养一周,随机挑选 45 只虾,活体解剖取其性腺以确定其性腺发育时期。实验设置试验组与对照组,每组设置 3 个重复,每个养殖水桶中放置 15 只虾。养殖水桶内设置水葫芦水草以及 PVC 管、塑料水瓶等物品制作的人工模拟洞穴,并采用气石增氧。

用 BS124S 型多功能精密电子天平称取 17 α -羟孕酮 0.2 g 溶于无水乙醇中,再用生理盐水配制成 0.2% 的工作液。将配制好的工作液置于烧杯中,对试验组进行浸泡处理,浸泡其腹部,浸泡时间为 1 min,采用实验前浸泡、10 天后浸泡、20 天后浸泡处理,对照组不作处理。分别于实验 10 天、20 天、30 天后从试验组与对照组取虾 10 只,活体解剖取其卵巢,观察其卵巢发育形态,然后保存并切片。切片用于 HE 染色观察,保存的卵巢组织提取 RNA 后,采用 RT-PCR 技术测定处理

前后基因在卵巢中的表达量变化。

2 结果

2.1 克氏原螯虾 *UB-E2* 基因的克隆与序列分析

克氏原螯虾 *UB-E2* 基因的 cDNA 序列全长 3 943 bp,包括 305 bp 的 5' 端非编码区(5'-UTR),675 bp 的开放阅读框(ORF),2 963 bp 的 3' 端非编码区(3'-UTR),在 3'-UTR 有加尾信号 AATAA。ORF 编码 224 个氨基酸,相对分子量 23.93 ku,等电点为 8.61。在其 82 ~ 219 位氨基酸序列为泛素结合酶家族特有的结构域,属于典型的 *UB-E2* 基因(图 1)。

SignalP 分析表明,克氏原螯虾 *UB-E2* 蛋白没有信号肽。TMHMM 分析表明,*UB-E2* 蛋白没有跨膜结构,不属于跨膜蛋白。通过 Phyre2 预测分析 *UB-E2* 蛋白的三级结构(图 2),其中 α 螺旋占推测序列的 26.34%, β 螺旋占推测序列的 12.05%,其余则为无规则卷曲为主。

```

1 GTTCCCGTCACCAGGCTCACCCGGCTCCTCTTCTCACCATCTCTCGCCTCTCCAG
61 CATAACCAGCAAGATACCACAGTACCCAGCAAGATAAAGGATCAGTAGAAGTGTGGCG
121 CGGCGGTGCGTGGCGTGCAGTGTGCGCCGCGTGTAGAGCCTCAGTTGCAGGCCGGCG
181 TTGATCAGCTGATCTGCAGGGAACAGCGGTGGCGTTAGCAGTAGAGTTGCTCAGCTCCA
241 GAGTCATGGAAAACCTCCATAATTTCTCGTCTCAGGCCCTCTCGTAAGAGTAGCAGT
1 M S A T P T G A L G S D S V P V S P P
301 GATTGATGCTCTGCGACACCTACTGGTGCCTCGGGTCTGACTCTGTCCCGTGTCTCCCG
20 L P P A T T G P Q T P T S S P V V S T G
361 CTCTTCCCGTCCCAACTGGTCCCAAAACCCCAACATCCTCCCGAGTTGTCTCTACTG
40 S T P V T Q S S S G T T R H S N S A R S
421 GCTCGACCCTGTCACGCAGAGTTCAGTGGCACTACACGACACTTAACTCGGCACGCT
60 S V A S E G R S S N P K M S K A L S T S
481 CTTCAAGTTCGAGTGAAGGACGTTTCAATCCCAAGATGTCAAAGGCACTCAGCACAA
80 A K R I Q K E L A E I T L D P P P N C S
541 GCGTAAAAGGATACAGAAGGAGTTGGCAGAGATCAGTTGGACCTCCACCAATTGTA
100 A G P K G D N L Y E W V S T I L G P P G
601 GTGCTGGACCCAAAGGTGACAACTTGTATGAGTGGGTTTCGACCATCTTGGGCCCCCTG
120 S V Y E G G V F F L D I H F S A E Y P F
661 GCTCCGCTACGAAGGTGGCGTCTTTTCTCGACATCCACTTTTCAGCAGAATATCCCT
140 K P P K V L F R T R I Y H C N I N S Q G
721 TTAAACACCTAAGGTTTGTTCGGACCCGAATTTATCACTGCAACATAAACTCTCAAG
160 V I C L D I L K D N W S P A L T I S K V
781 GGGTCACTGTCTGGATATCCTAAAAGGATAACTGGTCACTGCACTCACTATTTGAAAG
180 L L S I C S L L T D C N P A D P L V G S
841 TCCTCTCTCCATTTGTTCTTACTCACTGACTGCAACCCAGCCGATCCACTGGTGGGGA
200 I A T Q F L Q N R E E H D R I A R L W T
901 GCATTGCCACGAGTTCTCCAGAATAGGAAGAACATGACAGAATTGCTCGGCTCTGGA
220 K R Y A T *
961 CAAAACGTTACGCTACGTGATCACTTGTACCTAGTGTCAACAGGGTATTAAGCATCTCTT
1 021 GCACCATGCCATTTTGTGTTTTAAGCCAGCAAAAATAAAATAAAATCACTTGTGTT
1 081 ATGTAGGCATACATTTTATTATTACAAAATAGCTGGAAATAGAAAGCTTCTAAATTT

```

```

1 141 GTTTGTGGCATGGTGAATAGATTGTTGTCATCGTCATTACCTCATTTTCCAATATTTTC
1 201 CATGCTTTATCAAGCTCACTTTTTTTGTGCATCAGTATGGTATGATGGAAGTGAATCTA
1 261 TTCAGTGAGTTAGACTTGTTTTAATTTCTAGTTCAGTTCCTCATGACAGTATTTTGAT
1 321 GACTCCACTTATCATCCATGTACAATTTGGCACAACCTAAATAGCAGCAGTGCAGTGC
1 381 TCCATCTGAACTTGCCACCTAGCTGCCTCTCCTAGATAGCTTCCAGTCTGTCTATAGTAA
1 441 CAGTGCCACTAGTCTACTAGCTGTGTGCCACTAGTCTATTTGCAGTGTACCACACTCAG
1 501 TGTTCAGCCTTGTGAGAGTATTCTCTGCTCCCGAAGTACTGTAGGGGAGTTTGTGCTCT
1 561 TCCTCAGATGTTGCGAGAGAAAGCATTGCCACAACAGTCTTAGGGAGAAGTGTGTT
1 621 CAGCGATAAAGTTTGTGCTGATCCCACAGTGAATTTGAGCAAGCGTTATCCCGCAAAA
1 681 CTGTGATGGAGCCTGTTTTCCCCACACTTGTGAGGACTAAAGTCTCTCCACAGTGT
1 741 GTAAGGATCAGGATTTTTACAAGAGTTGAGAGATTGCATACGCTTTATACAGTGTGTG
1 801 TGGGAGTAAGTGTGCCCCCACAGCATCGTGAGATGAGTGCCTGTATCCCCACAAAAG
1 861 CTGTGTTAGCAAAATATTATCCCAAAAATTTGCAAAAACAGGACTGTCTTAGCATTGA
1 921 GGTGGGATTACAGTTTTTATAAGGCTATTGATGATGTAACATATATATATATATATATC
1 981 TACAGTATATATATACTCTTGTATGTATAAATTAGATTTATTTTTGTGGGAAAGGATAC
2 041 CCATTGATTTAAATGACAGGAATGTTTTGTGCAATGTGGTGCACCAGAGGCATTATTTT
2 101 GATTTAAAAATTTGTGTTCAATAAAAATTTTCAGGTTTGTAGTGCAGCTGGGTAATAATTTGG
2 161 AATGTAAGTACTAGTCTAAGTGTAGATATAAGTTCCAAAATTTAGGAATGATATATAAAAAA
2 221 AGATTTCCATCTCTGGGTTTGTGTTTCCATGTAGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTT
2 281 GAAGCTGCCTCATGTATGGTAACATCATTGAATCTTCTGGGCTATGAGTTAGCTGTGAA
2 341 TGTGAGTGAAGTGAGAGATGGAGATATTAAGGATTTCTTCACTTCCGTGATTTGTTTT
2 401 GAGTTGCTCAGTGTAGCTTGGCCAGATGAGTTAAGCTTTTACTGTTGCTTTGTGAAC
2 461 TGGAGAACAATAATCAGAATGTCCCCTTTTGTGCATGCAACAATACCTCATTATTTTGCCA
2 521 TTAGTGTGTTCTGTGTAGACATGTAGCATATAAATATTATTAATAAAGTGCACAGTGG
2 581 CTGATAAAGTGAAGGTAAGCATCCAGTCCGACTGGATGTTGGTGAACATTTTTTCC
2 641 TCGTAAAAAAGAACATTATCATTGATATATCTTCCCTTGTGACTTCTCTGTTCTCAC
2 701 AGGGAAGGTGCATTAATGTTGAGAAATGGACTCTTGAACATTACTGTTACATATAACG
2 761 GTGCTGGAGGTGCTTAAAGGAGATGGGAGTGTATCGTATGTAGCAGACATGCTTGAAC
2 821 AGTGTGTGCATATTTCTGTCTGTTGTGCGAATGCAAAAATGAAGTCAAGTGTGAAATAT
2 881 AATTTTTCTGGTATGATTAAGGTAAGTACTTTAAGGTTGGGGAGCCTTGTGTAGCATCCCTG
2 941 GCACAGTGTGGGCATACTGGAGCATGCAACTGCTGCAAAATGTTGCTTGCACACTGTAT
3 001 ACTTTGTCAATTAGCAAGATCTTGATAAAATTTAAATTTTCAATTTTGGCAGGACCAATTTT
3 061 ATTTTTTCTTAAATTCATAGTCCCTCCTAGAGTTTTAGTGTGAGTTCGAATGTGATCTAT
3 121 GAATGAGAACTACACAAAAATGTGTTGAGAATGGAATAATAAATGTTTAAAGAAAGCTT
3 181 TGCTGTACTCCATATCTACTCTTGAAGAATTTTTGTTGTATTTCGGAGAGACCAATACA
3 241 CACGTGTATGTGTGCTTGTGCCCTGTTGCAGAGCATGGTACTGTTGAGCATGCCTGTG
3 301 TGGTCATCCTGGGAAGTTAGAATGTTTTCCAAGTATGACTGTCATGTATATACAGTATA
3 361 CTTTTTAGGTAGATCATAACAGCAGCTACGGTCAAGAGTGTCTTAGCTGTATAAGCAGGA
3 421 CAGTATTGTAAACAAAATTTAGTAAATAATTTAAATATTGTTGACTTTGCAAGCTATG
3 481 AATAATTCACATCATGCTATTGAATACTGCACCGAATTTACTCTCATCTGGATTCAATCA
3 541 TCACCTGATGGCATTTTTATTTTCATATATCAGCCTTTTGTACATTTAAAGGGCATG
3 601 TGGTCCCCACCCCAAGAAATTAGGTAAGGGGCAATGATGGTGATTATGTTGGTTTTTG
3 661 TATAGAAAATACCTTAATTTGATTTTTTTTTATCACATAACAGGAGAGATGTGTGT
3 721 TAATTCATGTAATTAACACAGTAAATATGGTTTTAAATCAAGGATCACAACTTCTCTA
3 781 GTTATGATTAAGACTGCTGTATATTAGGTAATACTTCTGGCTTAAATCACCAACTTAT
3 841 CTCTGGAAAGGATTACTGGAGGAAGAGCTGCAGATTGCTCTGTGTATTGGTCTACACTTA
3 901 GTTCCAAATAAAACATGTAAGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 克氏原螯虾 *UB-E2* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *UB-E2* in *Procambarus clarkii*

下划线表示其结构域,波浪线表示加尾信号,双下划线表示起始密码子,*表示终止密码子

The underline indicates the ubiquitin-conjugating enzyme domain, the wave line indicates putative polyadenylation signals, the double underline indicates initiation codon, the asterisk indicates stop codon

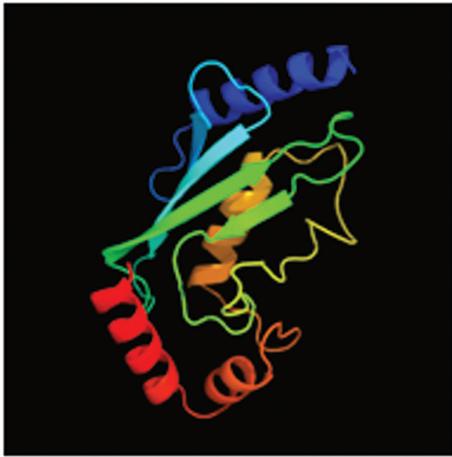


图2 克氏原螯虾 UB-E2 蛋白的三维结构预测
Fig.2 Three dimensional structure prediction of UB-E2 protein in *Procamburus clarkii*

2.2 系统进化分析

氨基酸多重序列比对后发现(图3),克氏原螯虾 UB-E2 氨基酸序列与黄翅菜叶蜂(*Athalia rosae*, XP-012264123.1) UB-E2 氨基酸序列的相似性最高,为 98%,与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*, AFU93451.1)、斑节对虾(*Penaeus monodon*, ACD13594.1)的相似性为 81%。MEGA5 建立 NJ 系统进化树(图4)显示,克氏原螯虾与凡纳滨对虾和斑节对虾亲缘关系最近,聚为一支,再与黄翅菜叶蜂、二疣犀甲(*Oryctes borbonicus*, KRT78970.1)、果蝇(*Drosophila willistoni*, XP-002064658.1)和美洲鲎(*Limulus polyphemus*, XP-013778274.1)等节肢动物聚为一大支;鱼类、哺乳类等单独聚为一支。

<i>P. clarkii</i>	MSATPTGAL	GSDSVPVSP	LPPATTGPQT	PTSSPVVSTG	STPVTQSSSG	TTR	-----	52
<i>L. vannamei</i>	MSASPAGAT	GSDSVPVSPS	NPPTTSPPS	SATSTIVSAG	SALSPSSTAT	SSQ	-----	52
<i>P. monodon</i>	MSASPAGAT	GSDSVPVSPS	NPPTTSPPS	SATLTAASAG	SALSPSSTAT	SSQ	-----	52
<i>A. rosae</i>	-----	-----	-----	MSSGAGSSG	TGRGRSSLA	DNK	-----	22
<i>O. borbonicus</i>	-----	-----	-----	MSTAGSSGSG	RGRNTQTAVG	EQK	-----	23
<i>L. polyphemus</i>	MSADRS	-----	-----LPSS	SRATTSSDRG	NDTQLAASTV	QDR	-----	33
<i>D. willistoni</i>	MSSISAAGSA	AGEVATSSAS	SNSSTPSTTA	SNANNQVTTA	GGPATATAPT	RGRGAANTNG	-----	60
<i>D. rerio</i>	MSSEVQ	-----	-----RPDD	SPSTSGGSSD	IEQRETAPPQ	QER	-----	33
<i>H. sapiens</i>	MSTEAEQ	-----	-----RVDD	SPSTSGGSSD	GDQRESVQQE	PER	-----	33
<i>M. musculus</i>	MSTEAEQ	-----	-----RVDD	SPSTSGGSSD	GDQRESVQQE	PDR	-----	33
<i>P. clarkii</i>	HSNSARS	SVASEGRSSN	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	109
<i>L. vannamei</i>	PSTPVEP	PVVREVRPHN	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	109
<i>P. monodon</i>	QSAPVEP	PVVREVRPHN	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	109
<i>A. rosae</i>	PEN	KEAKP	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	71
<i>O. borbonicus</i>	PES	KESKP	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	72
<i>L. polyphemus</i>	EFE	QKEQKIN	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	83
<i>D. willistoni</i>	GASGNTGGS	DEPRKDAKPT	PKMSKALSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	120
<i>D. rerio</i>	DLVAPK	KKETKIS	SKTAAKLSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	86
<i>H. sapiens</i>	EQVQPK	KKEGKIS	SKTAAKLSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	86
<i>M. musculus</i>	EQVQPK	KKEGKIS	SKTAAKLSTS	AKRIQKELAE	ITLDPPPNC	AGPKGDNLYE	-----	86
<i>P. clarkii</i>	WVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSAEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	169
<i>L. vannamei</i>	RVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSAEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	169
<i>P. monodon</i>	WVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSAEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	169
<i>A. rosae</i>	WVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSAEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	131
<i>O. borbonicus</i>	WVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSPEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	132
<i>L. polyphemus</i>	WVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSPEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	143
<i>D. willistoni</i>	WVSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSPEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	180
<i>D. rerio</i>	WRSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSPEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	146
<i>H. sapiens</i>	WRSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSPEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	146
<i>M. musculus</i>	WRSTILGPPG	SVYEGGVFFL	DIHFSPEYPF	KPPKVTFRTR	IYHCNINSQG	VICLDILKDN	-----	146

<i>P. clarkii</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	224
<i>L. vannamei</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	224
<i>P. monodon</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	224
<i>A. rosae</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	186
<i>O. borbonicus</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	187
<i>L. polyphemus</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	198
<i>D. willistoni</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLQNRE	EHDRIARLWT	KRYAT	235
<i>D. rerio</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYLINRT	EHDRIARLWT	KRYAT	201
<i>H. sapiens</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYMINRA	EHDRIARLWT	KRYAT	201
<i>M. musculus</i>	WSPAL TISKV	LLSICSL LTD	CNPADPLVGS	IATQYMINRA	EHDRIARLWT	KRYAT	201

图 3 不同物种 UB-E2 多重氨基酸序列比较

Fig. 3 Multiple alignment of UB-E2 amino acid sequence in different species

克氏原螯虾 (*P. clarkii*); 凡纳滨对虾 (*L. vannamei*, AFU93451. 1); 斑节对虾 (*P. monodon*, ACD13594. 1); 黄翅菜叶蜂 (*A. rosae*, XP-012264123. 1); 二疣犀甲 (*O. borbonicus*, KRT78970. 1); 美洲蜚 (*L. polyphemus*, XP-013778274. 1); 果蝇 (*D. willistoni*, XP-002064658. 1); 斑马鱼 (*Danio rerio*, NP-001003494. 1); 人类 (*Homo sapiens*, NP-689866. 1); 小鼠 (*Mus musculus*, NP-659088. 1)

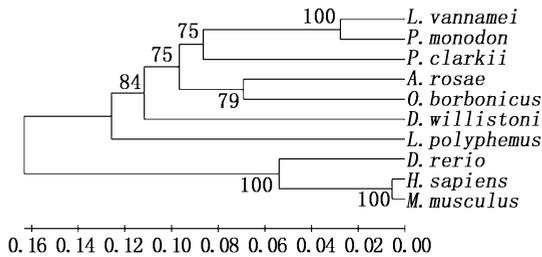


图 4 不同物种 UB-E2 蛋白的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of UB-E2 protein in different species

2.3 克氏原螯虾 UB-E2 基因表达分析

荧光定量结果显示(图 5),克氏原螯虾 UB-E2 基因在各组织中均有表达,其中在卵巢组织中的表达量显著高于眼、鳃、肝脏、心脏、肠、肌肉等组织($P < 0.05$)。而在卵巢发育各个时期中(图 6),UB-E2 基因在初期表达量最低,在成熟期表达量最高,并且从发育初期到成熟期,基因的表达量是递增的。

2.4 17 α -羟孕酮刺激结果分析

2.4.1 HE 染色分析

HE 染色结果显示(图版),第 10 天,试验组克氏原螯虾卵巢处于发育初期,对照组处于未发育期与发育初期之间;第 20 天,试验组处于卵黄发生前期,对照组处于发育初期;第 30 天,试验组处于卵黄发生期,对照组处于卵黄发生前期。

2.4.2 荧光定量分析

荧光定量结果显示,克氏原螯虾 UB-E2 基因

(图 7)在第 30 天的试验组性腺中表达量最高,在第 10 天的试验组性腺中表达量最低,其中第 10 天试验组的表达量低于对照组,第 20、30 天试验组的表达量显著高于对照组($P < 0.05$)。

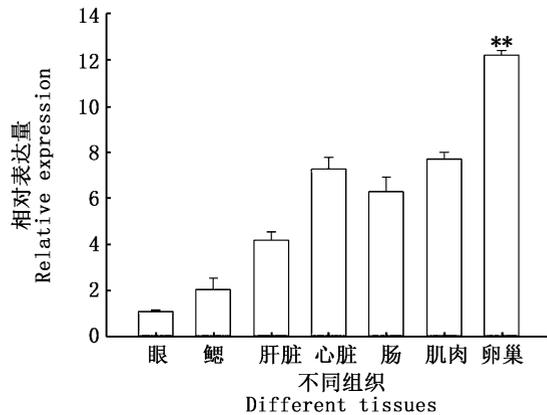


图 5 克氏原螯虾 UB-E2 基因在不同组织中的表达量

Fig. 5 Distribution pattern of UB-E2 in various tissues of *Procambarus clarkii*

柱状图中标注星号表示 UB-E2 基因在卵巢中的表达量显著高于其他组织, $P < 0.05$

The asterisk on the histogram indicates that the expression of UB-E2 in ovaries were significantly higher than other tissues, $P < 0.05$

3 讨论

泛素结合酶 E2 是泛素化过程中不可缺少的一个酶,在泛素化过程中发挥着重要的作用。泛

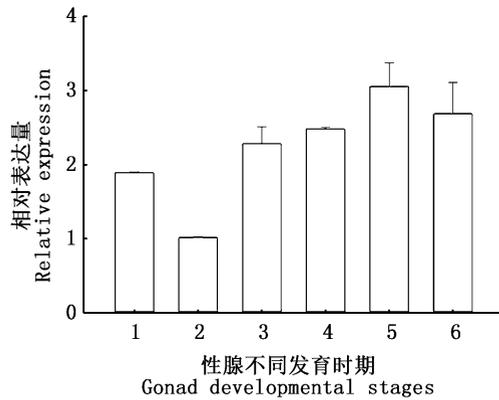


图6 克氏原螯虾 *UB-E2* 基因在卵巢发育不同时期的表达量

Fig. 6 The expression of *UB-E2* during gonad developmental stages in *Procamburus clarkii*

1. 未发育期; 2. 发育初期; 3. 卵黄发生前期; 4. 卵黄发生期;
5. 成熟期; 6. 产卵后期
1. Undeveloped period; 2. Early development; 3. Early stage of vitellogenesis; 4. vitellogenic stage; 5. mature period; 6. Anaphase of spawning

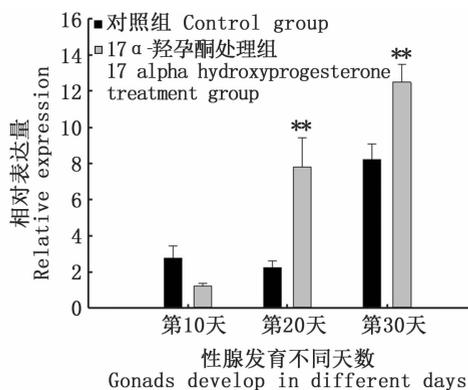


图7 克氏原螯虾 *UB-E2* 基因在卵巢激素刺激前后不同天数的表达量

Fig. 7 Expression of *UB-E2* gene in *Procamburus clarkii* on different days before and after ovarian hormone stimulation

素结合酶有许多种,含有 16 ~ 18 ku 的泛素结合结构域(UBC),并且有一个保守的活性位点半胱氨酸残基^[20]。泛素结合酶可以通过保守的半胱氨酸与泛素 C 端形成硫酯键,与泛素连接酶 E3 形成复合物^[21]。本研究结果显示,克氏原螯虾 *UB-E2* 基因的氨基酸序列与节肢动物 *UB-E2* 基因的氨基酸序列具有较高的同源性,与节肢动物聚为一大支。在图 3 中,克氏原螯虾 *UB-E2* 基因的氨基酸序列与凡纳滨对虾和斑节对虾 *UB-E2* 基因的氨基酸序列长度相同,而其他节肢动物则

与以上三者长度不同,因此出现了比对相似度高而同源性相对低的情况。而比对图中所有物种 *UB-E2* 氨基酸序列中的结构域序列,相似度均在 91% 以上,从而得出 *UB-E2* 基因在其进化过程中高度保守,与傅明俊等^[22] 所得结论相同,可以推测 *UB-E2* 基因在节肢动物中的作用有一定的相似性。

UB-E2 基因具有多种功能,其在卵子的发生和发育过程中也起到了重要作用。有研究表明,*Ube2C* 与小鼠卵母细胞的减数分裂有关^[23],*Ube2C*、*Ube2S* 以及 *Ube2D* 对于卵母细胞第一极体的排出有重要作用,并且与配子的发生有关^[24]。另外,LEELATANAWIT 等^[25] 研究发现 *UB-E2* 基因参与了斑节对虾的性腺发育过程。在本研究中,克氏原螯虾 *UB-E2* 基因在各组织中都有表达,但是在卵巢组织中的表达量显著高于其他组织,这与泛素结合酶 *E2r* 基因在克氏原螯虾卵巢中的表达情况一致^[26],由此可以推测 *UB-E2* 基因与克氏原螯虾的性腺发育有关,并且可能发挥着重要的作用。在卵巢的发育过程中,卵细胞内会进行一系列的蛋白质降解,而泛素化过程是细胞内蛋白质降解的主要途径。本研究中,*UB-E2* 基因的表达量从卵巢发育初期到成熟期逐渐递增,说明该基因可能参与了卵细胞内相关蛋白质的降解过程。这些结果表明 *UB-E2* 基因可能与卵巢的卵黄发生和积累以及成熟有关,其相关具体的功能和作用机制还有待进一步研究。

17 α -羟孕酮能够促进动物机体的性腺发育,同样对甲壳类动物的性腺发育也有促进作用。有研究表明^[27],17 α -羟孕酮能够促进南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 性腺中卵母细胞的发育,使之体积加快增大。同样赵维信等^[28] 发现 17 α -羟孕酮对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 卵黄发生前期和卵黄发生期卵母细胞卵径增大均有极显著刺激作用。本研究发现,在相同生活条件下,在一个月实验周期中分 3 次使用 17 α -羟孕酮刺激克氏原螯虾,试验组的性腺发育比对照组的性腺发育快了一个时期。这表明 17 α -羟孕酮刺激加快了克氏原螯虾性腺发育的速度。与孙瑞杰^[29] 对 17 α -羟孕酮对克氏原螯虾卵巢同步发育的影响的研究结果相同。图 6 的结果显示 *UB-E2* 基因的表达量从卵巢发育初期到成熟期逐渐递增,结合图版可以看出,激素刺激后基因表达

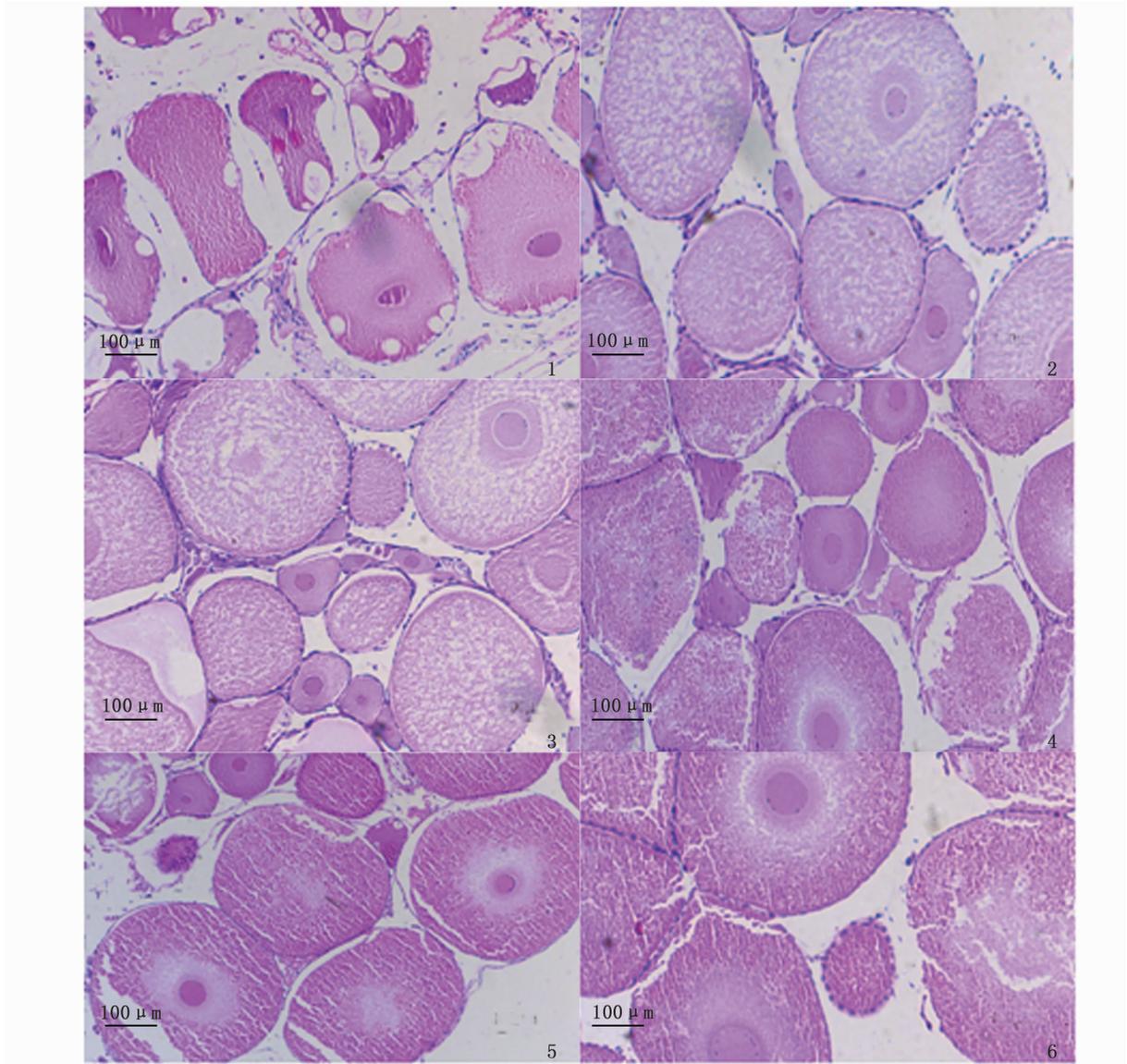
量的情况与图 6 中的发育时期一一对应并且一致,同时 *UB-E2* 基因在克氏原螯虾卵巢中的表达量显著上升,说明在克氏原螯虾生长情况相同的条件下性腺发育加快时,基因的表达量也具有着显著的变化。综上可以推测,*UB-E2* 基因在克氏原螯虾的发育过程中,可能通过 UPP 参与了抑制卵巢发育相关蛋白的降解,从而促进了卵巢的发育及卵黄的发生和积累。

本研究克隆获得了 *UB-E2* 基因 cDNA 全长,通过生物信息学分析以及系统进化分析了解了该基因的进化特征,通过荧光定量和激素刺激实验证明了该基因在克氏原螯虾性腺发育过程中的作用,为克氏原螯虾性腺发育的分子调控机制提供分子生物学资料。

参考文献:

- [1] 黄文虎, 龚世园. 克氏原螯虾雄性生殖系统的超微结构[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 514-521.
HUANG W H, GONG S Y. Histological studies on the male reproductive system of *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 514-521.
- [2] 丁建英, 康璉, 徐建荣. 克氏原螯虾肌肉营养成分分析与评价[J]. 水产科技情报, 2010, 37(6): 298-301.
DING J Y, KANG J, XU J R. Nutritional composition of analysis and evaluation of *Procambarus clarkii* [J]. Fisheries Science & Technology Information, 2010, 37(6): 298-301.
- [3] 慕峰, 吴旭干, 成永旭, 等. 克氏原螯虾胚胎发育的形态学变化[J]. 水产学报, 2007, 31(s1): 6-11.
MU F, WU X G, CHENG Y X, et al. External morphological character during the embryonic development of *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(s1): 6-11.
- [4] 李胜, 赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 12-18.
LI S, ZHAO W X. Structural changes of mandibular organ during the ovary developing cycle in crayfish [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1999, 8(1): 12-18.
- [5] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system [J]. Annual Review of Biochemistry, 1998, 67: 425-479.
- [6] YE Y H, RAPE M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(11): 755-764.
- [7] NEUTZNER M, NEUTZNER A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination [J]. Essays in Biochemistry, 2012, 52: 37-50.
- [8] PICKART C M. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 70: 503-533.
- [9] DIKIC I, WAKATSUKI S, WALTERS K J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(10): 659-671.
- [10] REYES-TURCU F E, VENTH K H, WILKINSON K D. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes [J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78: 363-397.
- [11] NIJMAN S M B, LUNA-VARGAS M P A, VELDS A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes [J]. Cell, 2005, 123(5): 773-786.
- [12] AMERIK A Y, HOCHSTRASSER M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2004, 1695(1/3): 189-207.
- [13] 丁祺, 宋旭东. 泛素化/去泛素化系统介导的蛋白质降解与肿瘤关系的研究 [J]. 中国医药指南, 2009, 7(9): 46-49.
DING Q, SONG X D. Study on the relationship between protein degradation and tumor mediated by ubiquitination/deubiquitination system [J]. Guide of China Medicine, 2009, 7(9): 46-49.
- [14] SHEN B L, ZHANG Z P, WANG Y L, et al. Differential expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2r in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(5): 1149-1157.
- [15] KWON J, WANG Y L, SETSUIE R, et al. Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice [J]. Biology of Reproduction, 2004, 71(2): 515-521.
- [16] JIANG H C, QIAN Z J, LU W, et al. Identification and characterization of reference genes for normalizing expression data from red swamp crawfish *Procambarus clarkii* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9): 21591-21605.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] GIGLIOTTI E. Discovering statistics using SPSS. Second Edition [J]. Journal of Advanced Nursing, 2007, 58(3): 303.
- [19] WASS J A. SigmaPlot 11: Now with Total SigmaStat Integration [Z]. Scientific Computing, 2009.
- [20] FURUKAWA M, OHTA T, XIONG Y. Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(18): 15758-15765.
- [21] SUNG P, PRAKASH S, PRAKASH L. Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions [J]. Proceedings of the National Academy of

- Sciences of the United States of America, 1990, 87(7): 2695-2699.
- [22] 傅明骏, 赵超, 周发林, 等. 斑节对虾泛素结合酶 PmUbc 基因的克隆及表达分析[J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 41-48.
- FU M J, ZHAO C, ZHOU F L, et al. Molecular cloning and expression analysis of Ubiquitin-conjugating enzyme gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(6): 41-48.
- [23] BEN-ELIEZER I, POMERANTZ Y, GALIANI D, et al. Appropriate expression of Ube2C and Ube2S controls the progression of the first meiotic division [J]. The FASEB Journal, 2015, 29(11): 4670-4681.
- [24] KIRENBERG I, SHAHAR-POMERANTZ Y, ELBAZ J, et al. New insights into the ubiquitin-proteasome pathway in oocytes resuming meiosis [J]. Biology of Reproduction, 2012 (s1): 126.
- [25] LEELATANAWTT R, SITTIKANKEAW K, YOCAWIBUN P, et al. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 152(1): 66-76.
- [26] 钱照君, 祝天谅, 姜虎成, 等. 克氏原螯虾泛素结合酶 *E2r* 基因的克隆及表达分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(5): 641-651.
- QIAN Z J, ZHU T L, JIANG H C, et al. Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme *E2r* in *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(5): 641-651.
- [27] TSUKIMURA B, KAMEMOTO F I. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 1991, 92: 59-66.
- [28] 赵维信, 贾江, 安苗. 外源激素和眼柄提取物对罗氏沼虾卵母细胞的离体诱导作用 [J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(4): 221-225.
- ZHAO W X, JIA J, AN M. In vitro induction effects of exogenous hormones and eyestalk extracts on the oocytes of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1996, 5(4): 221-225.
- [29] 孙瑞杰. 克氏原螯虾卵巢同步发育及产卵环境的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- SUN R J. Study on ovarian synchronization development and spawning environment of *Procambarus clarkii* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.



图版 克氏原螯虾卵巢 HE 染色

Plate Developing stage of ovary in *Procambarus clarkii* with hematoxylin and eosin

1,3,5 为对照组,2,4,6 为试验组;1,2 为实验第 10 天,3,4 为实验第 20 天,5,6 为实验第 30 天

1, 3 and 5 were the control groups, 2, 4 and 6 were the experimental groups; 1 and 2 were tenth day, 3 and 4 were twentieth day, and 5 and 6 were thirtieth day

Cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme *E2* gene of *Procambarus clarkii*

SHI Baotong¹, QIAN Zhaojun¹, WANG Hui², LU Wei³, NIU Donghong¹, LI Jiale¹

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Huaiyin Teachers College, Huaian 223001, Jiangsu, China; 3. Manjianghong Lobster Industry Co Ltd Jiangsu Xuyi, Huaian 223001, Jiangsu, China)

Abstract: In this study, the full-length cDNA of *UB-E2* was obtained using RACE technology in *Procambarus clarkii*. The expression of *UB-E2* gene in different tissues and development stages and the expression of *UB-E2* and gonadal development after hormone stimulation by 17α -hydroxyprogesterone were studied by RT-PCR. The results showed that the gene has a full-length sequence of 3 943 bp, an open reading frame of 675 bp, encoding 224 amino acids, a relative molecular weight of 23.93 ku, and an isoelectric point of 8.61. Its amino acid sequence from 82 to 219 is unique protein domain of the ubiquitin-conjugating enzyme family. The amino acid sequence alignment showed that *UB-E2* gene of *Procambarus clarkii* had higher homology with arthropod *UB-E2* gene. Phylogenetic analysis showed that the *UB-E2* gene was clustered with *L. vannamei* and *P. monodon*. Quantitative fluorescence results showed that the expression of *UB-E2* gene in ovary tissue of *Procambarus clarkii* was significantly higher than the other tissues ($P < 0.05$); it was the lowest in the early stage of ovarian development, then it gradually increased, and it began to decline in the late spawning period; 17α -hydroxyprogesterone stimulation results showed that the ovarian development of the experimental group was significantly accelerated, while the *UB-E2* gene expression was also significantly increased, ovarian development and *UB-E2* gene expression were consistent with 17α -hydroxyprogesterone stimulated response. It is speculated that *UB-E2* gene plays an important role in ovarian development and gametogenesis in *Procambarus clarkii*. This study will provide a theoretical basis for the molecular regulation of gonad development in *Procambarus clarkii*.

Key words: *Procambarus clarkii*; gonad; *UB-E2*; expression